

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
2 de Octubre de 2003 (02.10.2003)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 03/080083 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: A61K 35/76,
A61P 35/00, C12N 7/04, 15/861

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES03/00140

(22) Fecha de presentación internacional:
25 de Marzo de 2003 (25.03.2003)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 200200716 26 de Marzo de 2002 (26.03.2002) ES

(71) Solicitantes e

(72) Inventores: ALEMANY BONASTRE, Ramon [ES/ES];
Institut Català d'Oncologia, Avenida Gran Via, Km 2,7,

E-08907 L'Hospitalet (ES). CASCALLÓ PIQUERAS,
Manel Maria [ES/ES]; Institut Català d'Oncologia,
Avenida Gran Via, Km 2,7, E-08907 L'Hospitalet (ES).

(74) Mandatario: ISERN JARA, Jorge; Avenida Diagonal,
463 bis 2º, E-08036 Barcelona (ES).

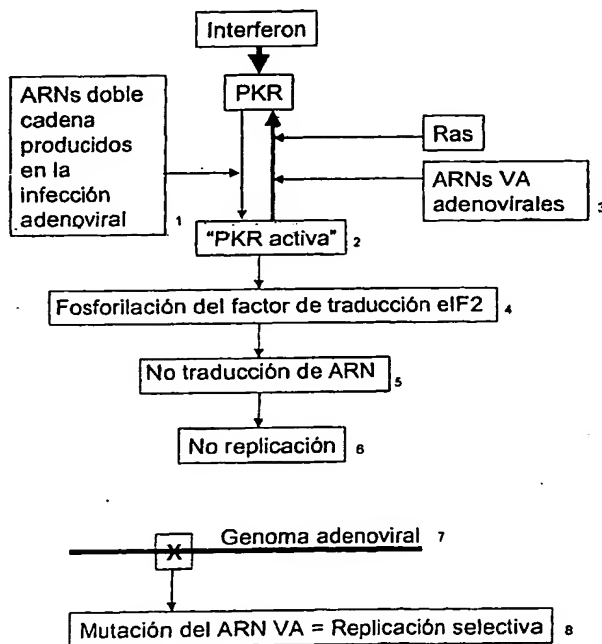
(81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (regional): patente ARIPO (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente
euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: USE OF ADENOVIRUSES MUTATED IN THE VA GENES FOR CANCER TREATMENT

(54) Título: USO DE ADENOVIRUS MUTADOS EN LOS GENES VA PARA EL TRATAMIENTO DEL CANCER



(57) Abstract: The invention relates to the use of an adenovirus for cancer treatment. The invention is characterised in that the adenovirus is defective in the virus-associated (VA) RNAs thereof, said adenovirus having a mutation in the sequence of gene VAI or VAII or both. Said adenovirus can also have a mutation in the sequences that control the expression of the VA RNAs.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a la utilización de un adenovirus para el tratamiento del cáncer caracterizado por el hecho que el adenovirus es defectivo en sus ARNs virus asociados (VA), dicho adenovirus tiene una mutación en la secuencia del gen VAI ó VAII o ambos. Este adenovirus también puede tener una mutación en las secuencias que controlan la expresión de los ARNs VA.

- 1 DOUBLE-STRAND RNAs PRODUCED IN THE ADENOVIRAL INFECTION
2 ACTIVE PKR
3 ADENOVIRAL VA RNAs
4 PHOSPHORYLATION OF TRANSLATION FACTOR eIF2
5 NO TRANSLATION OF RNA
6 NO REPLICATION
7 ADENOVIRAL GENOME
8 MUTATION OF VA RNA = SELECTIVE REPLICATION

6/pts

Uso de adenovirus mutados en los genes VA para el tratamiento del cáncer

El campo de la invención está relacionado en términos generales con el campo de la biología tumoral. En particular la invención se refiere a adenovirus mutados en los genes de VA RNAs y su uso para inhibir el cáncer.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

El tratamiento actual del cáncer se basa principalmente en la quimioterapia, radioterapia y cirugía. Pese a una elevada tasa de curación para el cáncer en estadios tempranos, la mayoría de casos avanzados de cáncer son incurables porque no pueden ser extirpados quirúrgicamente o porque las dosis radio o quimioterapéuticas administradas se ven limitadas por su toxicidad en células normales. La transferencia de material genético para inhibir o destruir tumores supone una alternativa terapéutica muy prometedor. Comparada con las estrategias convencionales esta estrategia de terapia génica busca ser más específica para las células malignas atacando los defectos genéticos de las células tumorales. Existen varias estrategias que usan ADN como agente terapéutico: la transferencia de genes que estimulan respuestas inmunes antitumorales, la transferencia de genes tóxicos o que activan la toxicidad de drogas, y la transferencia de ADN para bloquear o restablecer la expresión de genes involucrados en el desarrollo de tumores (oncogenes, genes supresores tumorales, genes antiangiogénicos, etc).

Además del ADN terapéutico, el otro componente de la terapia génica es el vehículo que transporta este ADN: el vector. Para aumentar la transferencia de ADN a las células diana se ha usado vectores sintéticos y derivados de virus. Estos últimos son en general más eficientes para transferir ADN o transducir células tumorales. De entre distintos tipos de virus se han desarrollado vectores virales a partir de retrovirus, Herpes Simplex virus, virus adeno-asociado y adenovirus entre otros. En terapia génica del cáncer el adenovirus se ha usado preferentemente por su elevada capacidad de infectar células epiteliales, que suponen el origen de la mayoría de tumores sólidos. Otras ventajas de los vectores adenovirales son que pueden transferir el ADN a células que no están en división, que el ADN del vector no se integra en el genoma de la célula transducida, que estos vectores se pueden purificar hasta concentraciones de 10^{13} partículas virales por mililitro

y que son estables en el torrente circulatorio por carecer de envueltas lipídicas.

El adenovirus es un virus de ADN sin envuelta lipídica caracterizado por
5 presentar una cápside icosaédrica que empaqueta un ADN linear de doble
cadena de aproximadamente 36 kilobases. Hay 50 serotipos de adenovirus
humanos que se clasifican en seis subgrupos (A a F) según propiedades
estructurales y funcionales como la aglutinación de eritrocitos. En terapia
10 génica se ha utilizado preferentemente el adenovirus tipo 5 por estar bien
caracterizado molecularmente y por su baja patogenicidad en humanos. De
hecho, el 85% de la población ha sido infectada con adenovirus y es
seropositiva en cuanto a la presencia de anticuerpos antiadenovirales. El
adenovirus tipo 5, en particular, causa un resfriado en niños que en la
15 mayoría de los casos es asintomático.

Distintos vectores adenovirales deleccionados en E1 se han usado con poco
éxito para el tratamiento del cáncer en ensayos clínicos. Se ha comprobado
que la limitación de su eficacia reside en el escaso número de células que el
vector alcanza. El gran tamaño de la partícula viral, 80 nm de diámetro,
20 dificulta su difusión y sólo unas pocas capas de células tumorales más allá
del punto de inyección o de los vasos sanguíneos son alcanzadas por el
vector. Esta limitación es particularmente relevante en estrategias
terapéuticas basadas en la introducción de genes citotóxicos o supresores
tumorales a pesar de que se ha encontrado un efecto citotóxico colateral en
25 células no transducidas cercanas a las transducidas. Incluso inyectando dosis
elevadas múltiples de vector, la mayoría de las células tumorales no se ven
afectadas por el vector. En años recientes la propagación selectiva del vector
en células tumorales se ha propuesto como una estrategia para solventar
esta limitación (R. Alemany et al., Nature Biotechnology 2000. Vol 18, pp.
30 723-7). La replicación viral por sí misma es citopática por lo que no se
necesitan genes citotóxicos o supresores tumorales para obtener un efecto
antitumoral. En cierto modo el concepto de un adenovirus que se replica
selectivamente en células tumorales sin llevar ningún gen no viral pertenece
más propiamente al campo de la terapia viral o viroterapia del cáncer que al
35 campo de la terapia génica. Sin embargo puesto que genes citotóxicos,
imunoestimuladores o supresores tumorales pueden potenciar la toxicidad
selectiva del adenovirus replicativo, dichos genes se han insertado dentro del

genoma del adenovirus replicativo. Estos vectores de replicación selectiva enlazan así los conceptos de viroterapia y terapia génica.

La viroterapia o utilización de virus para el tratamiento del cáncer es muy anterior a la terapia génica. Las primeras observaciones de curaciones de tumores con virus datan de principios del siglo pasado. Hay virus que presentan un oncotropismo natural. Por ejemplo, la replicación del parvovirus parece estar ligada a la transformación maligna de la célula por un mecanismo todavía incierto. El virus de la estomatitis vesicular (VSV) presenta un oncotropismo asociado a los efectos antivirales del interferón. El VSV es muy sensible a la inhibición por interferón y las células tumorales a menudo no responden a los efectos del interferón por lo que presentan una respuesta antiviral deficiente. Otro virus que se ha identificado recientemente como oncotrópico es el reovirus (Norman and Lee, Journal of Clinical Investigation. 2000. Vol 105, pp. 1035-8). Las células infectadas reaccionan frente a la producción de ARN de cadena doble (dsRNA) producidas durante la infección con reovirus y otros virus activando una quinasa dependiente de dsRNA (PKR). La PKR así activada bloquea la síntesis de proteínas al fosforilar la unidad alfa del factor de traducción eIF2. Este bloqueo de la traducción de ARN mensajero bloquea también la traducción de ARN viral y con ello la replicación del virus. Muchos tipos de virus expresan genes que inactivan la PKR pero el reovirus no. Sin embargo, la PKR puede ser inactivada por otras proteínas que se hallan en la vía de transducción de señal de Ras. Por ello en células con Ras activo, como es el caso de muchas células tumorales, el reovirus puede propagarse. Otros virus no muestran un oncotropismo natural sino que se pueden manipular genéticamente para que se repliquen selectivamente en tumores. Por ejemplo el Herpes Simplex virus (HSV) se ha hecho oncotrópico al deleccionar el gen de la ribonucleótido reductasa, una actividad enzimática dispensable en células en proliferación activa como las células tumorales. El HSV también se ha hecho oncotrópico deleccionando la proteína ICP34.5 que contrarresta el bloqueo de la traducción mediado por PKR. Su delección resulta en un oncotropismo por un mecanismo similar al del reovirus. Recientemente otro virus que se ha manipulado para que presente oncotropismo es el virus Influenza A (Bergmann et al., Cancer Research 2001. Vol 61, pp. 8188-93). La proteína viral NS1 de este virus también contrarresta el bloqueo traduccional por PKR y su delección resulta en un virus que depende de Ras activo. Sin embargo

ha sido con adenovirus dónde se han realizado más manipulaciones genéticas para conseguir replicación selectiva en tumores. El papel protagonista de los adenovirus en la terapia génica del cáncer junto con la experiencia acumulada en ensayos clínicos han contribuido a la popularidad de estos nuevos vectores adenovirales replicativos.

Se han usado dos métodos para restringir la replicación de adenovirus a células tumorales: la substitución de promotores virales por promotores selectivos de tumor y la delección de funciones virales que no son necesarias en células tumorales. En ambas estrategias el gen a regular o mutar preferiblemente es E1a porque controla la expresión de los demás genes virales. Muchos promotores específicos de tejido o de tumor se han usado para controlar la expresión de E1a. Con respecto a la estrategia de deleccionar funciones virales que no son necesarias en células tumorales, el primer mutante que se ha propuesto como de replicación selectiva presentaba una delección de E1b-55K. Esta proteína une e inactiva p53 para inducir en la célula infectada la entrada en fase S del ciclo celular e inhibir una apoptosis mediada por p53 que se dispara como consecuencia de esta inducción. Un adenovirus mutado en E1b-55K conocido como dl1520 o Onyx-015 se ha usado para tratar tumores defectivos en p53. Otra mutación realizada en el genoma adenoviral para conseguir replicación selectiva en tumores afecta a los dominios CR1 y CR2 de E1a. Estos dominios de E1a median la unión a las proteínas de la familia del Retinoblastoma (RB). Las proteínas RB bloquean la transición de la fase Go/G1 a la fase S del ciclo celular formando un complejo inhibidor de la transcripción junto con E2F. Cuando E1a se une a RB se libera el factor de transcripción E2F del complejo RB-E2F y E2F actúa como un activador transcripcional de los genes responsables del paso a la fase S y de genes virales como E2. La liberación de E2F es de este modo un paso clave para la replicación del adenovirus. En células tumorales el ciclo celular está fuera de control debido a que RB está ausente o inactivado por hiperfosforilación y E2F está libre. En estas células la función inactivadota de RB de E1a ya no es necesaria. Por ello un adenovirus con una mutación en E1a que impide su unión a RB se puede propagar normalmente en células con RB inactivo. La replicación selectiva de dichos mutantes ya ha sido demostrada (Fueyo et al., Oncogene 2000. Vol 19, pp. 2-12).

La presente invención describe un nuevo tipo de mutación para conseguir replicación selectiva en células tumorales con un defecto genético determinado distinto a las vías de p53 y RB. Al contrario de otras construcciones existentes en el campo, en la presente invención el ADN diana de la mutación no produce ninguna proteína viral sino un ARN virus-asociado (VA) y no pertenece a los genes adenovirales tempranos sino a los tardíos. Sin ningún dato experimental, en WO 01/35970 se menciona la utilización de un adenovirus modificado en el cual el gen VAI no se transcribe; sin embargo, en la técnica nunca se ha mencionado la utilización conjunta de adenovirus mutados en el gen VAI y en el gen VAII simultáneamente.

El defecto genético atacado en la presente invención es la vía de transducción de señal del oncogén Ras, una vía que no ha sido previamente atacada con adenovirus. Muchos receptores de factores de crecimiento activan las proteínas Ras (H-Ras, N-Ras, K-Ras A y K-Ras B) para translucir una señal proliferativa desde el exterior de la célula al núcleo. Las proteínas Ras son pequeñas GTPasas que cuando se unen a GTP son capaces de activar una serie de efectores. La activación de los efectores lleva a la señal mitogénica. Ras se halla mutada a una forma permanentemente activa en el 90% de los tumores de páncreas, 50% de colon, 30% de pulmón y en otras proporciones en muchos otros tipos de tumores. Además de un gran número de tumores con Ras mutado, la vía de Ras se halla activada en otros casos por la activación constitutiva de proteínas que regulan Ras o de los efectores de la vía de Ras. Por ejemplo el gen c-erbB que codifica el receptor de EGF receptor se sobre-expresa en el 50% de glioblastomas y su homólogo c-erbB2 se sobre-expresa frecuentemente en cáncer de mama y ovario. En general se considera que el 80 % de los tumores presentan la vía de Ras activada. Muchos de estos tipos de tumores, como es el caso del cáncer de páncreas, necesitan nuevas terapias dada la falta de respuesta a la terapia convencional.

30

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la utilización de un adenovirus para el tratamiento del cáncer caracterizado por el hecho que el adenovirus es defectivo en sus ARNs asociados (VA).

35

También se refiere a la utilización de un adenovirus en la que dicho adenovirus tiene una mutación en la secuencia del gen VAI y VAII.

Otro objeto de la invención es la utilización en la de un adenovirus y que dicho adenovirus tiene una mutación en las secuencias que controlan la expresión de los ARNs VA.

5 Otro objeto de la invención es la utilización de un adenovirus en la que dicho adenovirus se inyecta en el tumor, en una cavidad donde se localiza el tumor o en el torrente sanguíneo de un paciente con cáncer.

Otro objeto de la invención es la utilización de un adenovirus que dicho adenovirus se combina con otras modalidades terapéuticas contra el cáncer como la quimioterapia o la radioterapia.

10 Aún otro objeto de la presente invención es una composición que comprende un adenovirus con mutaciones genéticas en los genes de ARNs VA para conseguir replicación selectiva en células tumorales con una vía de Ras activa o refractarias a la acción del interferón.

15 Aún otro objeto de la presente invención es una composición para utilizar en el tratamiento del cáncer que comprende un adenovirus con mutaciones genéticas en los genes de ARNs VA y en uno o más genes del grupo E1a, E1b y E4 para conseguir replicación selectiva en tumores.

20 Aún otro objeto de la presente invención es una composición para utilizar en el tratamiento del cáncer que comprende un adenovirus con mutaciones genéticas en los genes de ARNs VA y a su vez promotores que regulan uno o más genes del grupo E1a, E1b y E4 para conseguir replicación selectiva en tumores.

25 Aún otro objeto de la presente invención es una composición que comprende un adenovirus con mutaciones genéticas en los genes de ARNs VA para conseguir replicación selectiva en células tumorales y modificaciones en su cápside para aumentar su infectividad o dirigirlo a un receptor presente en una célula tumoral.

30 Aún otro objeto de la presente invención es una composición que comprende un adenovirus con mutaciones genéticas en los genes de ARNs VA que le confieren replicación selectiva en células tumorales y que a su vez que contiene otros genes usados comúnmente en el campo de terapia génica del cáncer como activadores de prodrogas, supresores tumorales o inmunoestimuladores.

35 Aún otro objeto de la presente invención es una composición que comprende un adenovirus humano derivado de un serotipo entre el 1 al 50 con mutaciones genéticas en los genes de ARNs VA que confieren replicación selectiva en células tumorales.

La presente invención describe el uso de adenovirus mutantes de los genes VA ARN para el tratamiento del cáncer. La mutación de VA ARN permite conseguir que la replicación del adenovirus esté condicionada a la existencia de una vía de Ras activa o a la falta de activación de PKR por insensibilidad a interferón. La invención se dirige hacia la necesidad de hallar mejores terapias para el cáncer de páncreas, colon, pulmón y otros en tipos de tumores.

La presente invención comprende adenovirus que contienen mutaciones en su genoma que eliminan la función inactivadora de PKR de los ARNs virus-asociados (VA). Existen dos genes que codifican ARNs VA en el genoma del adenovirus, VAI y VAII, localizados aproximadamente a 30 unidades de mapa del genoma viral. Ambos producen un ARN corto (de unos 160 ribonucleótidos) sintetizados por la ARN-polimerasa III en la fase tardía del ciclo viral. Cada ARN VA se pliega formando un bucle que se une a la quinasa dependiente de ARN, la PKR. Con el fin de propagarse el adenovirus usa los VA ARNs para inhibir la PKR pues de otro modo esta quinasa fosforila el factor de traducción de proteínas eIF2 inactivándolo y bloqueando la síntesis general de proteínas. Por ello los mutantes VA descritos en esta invención se propagan mal en células normales. Por el contrario en células donde la PKR ya es inactivada por la vía de Ras, como ocurre en muchas células tumorales, estos mutantes se propagan normalmente. En células que no responden a la infección con adenovirus induciendo la PKR, los mutantes VA también se propagan normalmente.

Las mutaciones de ARNs VA de esta invención pueden afectar a los genes VAI y VAII. Alternativa o simultáneamente las mutaciones pueden afectar los promotores de los genes VAI o VAII o a sus secuencias de terminación transcripcional para impedir su expresión.

Los adenovirus mutantes en VA se propagan y amplifican en líneas celulares con la vía de Ras activa como la línea de carcinoma de páncreas humano NP9. Después de su amplificación en cultivos celulares los mutantes se extraen y purifican siguiendo métodos estándar en el campo de la adenovirología.

El tratamiento del cáncer se realiza por inyección directa del mutante VA dentro del tumor o por administración endovenosa sistémica en pacientes afectados de cáncer usando métodos estándar en el campo de terapia génica con adenovirus.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los dibujos incluidos en la invención se han anexoado con el propósito de que las características, ventajas, y construcciones de la invención queden claras y se entiendan con detalle. Esos dibujos forman parte de las especificaciones e ilustran las invenciones preferidas pero no deben ser considerados limitativos del ámbito de la invención.

Figura 1: Estructura secundaria del ARN VAI del adenovirus serotipo 5 (Ad5).

- Una estructura de tallos y asas se forma por apareamiento de bases siguiendo las reglas de complementariedad de Watson y Crick. El dominio central es crítico para la función VA y el tallo apical también esta involucrado en la interacción del ARN VAI con la PKR.
- Figura 2: Secuencia de la región VA Ad5. La secuencia de ADN mostrada corresponde a los pares de bases 10500 a 11100 del genoma del adenovirus serotipo 5. Esta secuencia contiene la región VA (sólo se muestra la cadena con sentido respecto a los genes VA). La secuencia mostrada va desde el par de bases (bp) -118 relativo al inicio de transcripción del gen VAI hasta 64 bp más allá del sitio de terminación de VAI. El gen VAI (160 bp) desde el inicio hasta el final de transcripción está subrayado y en *itálicas*. Una secuencia de 96 bp separa las secuencias codificantes de VAI y VAI. VAI (161 bp) se halla después de VAI y se muestra subrayado en **negrita**.
- Figura 3: Mecanismo de selectividad de la replicación de adenovirus defectivos en ARNs VA en células con la vía de RAS activa o refractarias a interferón. Mecanismo por el cual los mutantes de ARNs virus-asociados (VA) muestran replicación condicionada a la activación de Ras. La infección adenoviral produce ARNs de cadena doble que inducen la activación de PKR por fosforilación. La PKR activada fosforila el factor de traducción de proteínas eIF2 y lo inactiva, bloqueando así la traducción general de proteínas. Los ARNs VA del adenovirus se unen e inactivan la PKR para contrarrestar esta respuesta antiviral de la célula infectada. Los adenovirus mutantes de ARNs VA no pueden inhibir la PKR e impedir el bloqueo general de la síntesis proteica. Sin embargo por otro lado la activación de la vía oncogénica de Ras también inhibe la PKR y cuando ésta se halla activa los mutantes VA se propagan normalmente.

Figura 4: Efecto de la activación de Ras en la propagación de los mutantes de ARNs VA. Gráfico de la producción de virus en 293 (replicación, día 2). La línea celular 293 presenta bajos niveles de Ras activado. Un plásmido que contiene un cassette de expresión de un mutante dominante negativo de Ras (RasN17) se transfectó en 293 y se evaluó la eficacia de propagación de un adenovirus mutante del ARN VAI (dl331). La inhibición de Ras que puede observarse en el western blot es capaz de inhibir la propagación de dl331. Por el contrario cuando se transfectó 293 con un plásmido que contenía un cassette de expresión de un mutante constitutivamente activo de Ras (RasV12) se observó la activación de Ras por western blot y el aumento de la propagación de dl331.

Figura 5: Propagación de un adenovirus mutado en ARN VAI en células con baja (293) o alta (NPA) actividad de RAS. Gráfico del efecto citopático (CPE) cuantificado por BCA (día 5). Comparación de la propagación de mutantes de ARNs VA en células con baja actividad de Ras y células de carcinoma pancreático con elevados niveles de Ras activo. La propagación del adenovirus salvaje Ad5 se usa como control de normalización para corregir las diferencias de infectividad y replicación que no pueden ser adscritas a la mutación VA.

Figura 6: Tratamiento de tumores con un mutante de ARN VA. Tumores de cáncer de páncreas humano NP9 fueron implantados en ratones inmunosuprimidos (ratones desnudos Balb/c). Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 70 - 80 mm³ fueron inyectados con adenovirus mutante de ARN VAI (dl331) o con vehículo control. Después de midió la progresión tumoral (volumen del tumor). Se demuestra el efecto antitumoral del mutante de ARN VA.

EXPOSICION DETALLADA DE MODOS DE REALIZACIÓN

Estructura de los adenovirus mutados en ARNs Virus-asociados (VA).

La presente invención describe el uso de adenovirus mutados (es decir funcionalmente defectivos) en sus genes que codifican los ARNs virus-asociados (VA) para el tratamiento del cáncer. El tratamiento se basa en la replicación selectiva de los mutantes VA en células con la vía de Ras activa.

Además los tumores resistentes a los efectos antivirales del interferón (interferones alfa, beta y gamma) también pueden ser tratados con estos mutantes. Los mecanismos que permiten esta replicación condicionada a Ras activo o a resistencia a interferón se detallan a continuación.

- 5 En el citoplasma de células infectadas con adenovirus se detectan grandes cantidades de unos pequeños ARNs que se han llamado asociados al virus o virus-asociados (VA). Estos ARNs están sintetizados por la ARN polimerasa III celular por transcripción de unos genes adenovirales localizados aproximadamente a 30 unidades de mapa del genoma adenoviral. Algunos
- 10 serotipos de adenovirus sólo contienen un gen VA (los pertenecientes a los subgrupos A y F, y algunos serotipos del subgrupo B) mientras que otros contienen dos genes VA (VAI y VAII presentes en algunos serotipos del subgrupo B y en todos los serotipos de los subgrupos C, D y E). Los ARNs VA tienen unos 160 ribonucleótidos y forman una estructura secundaria
- 15 caracterizada por tallos de doble cadena y bucles de cadena sencilla (véase Figura 1). Este ARN VA compite en su unión a una quinasa de proteínas llamada PKR con otros ARNs de cadena doble producidos durante la infección adenoviral. La PKR es una proteína quinasa cuya actividad fosforilante depende de ARN de doble cadena; sin embargo la unión a ARN
- 20 VA en lugar de activarla la inhibe. Esta función de los ARNs VA es necesaria para la replicación viral puesto que la PKR activada fosforila el factor de iniciación de la traducción proteica eIF2 inactivándolo y bloqueando la síntesis de proteínas. Por otro lado se ha descrito que PKR puede ser inhibida por Ras (Mundschau and Faller, Journal Biological Chemistry. 1992.
- 25 Vol 267, pp. 23092-8). Con respecto a la inhibición de PKR, la vía de transducción de Ras que se halla activada en un gran número de tumores es funcionalmente análoga a los ARNs VA. Conectando estas observaciones la presente invención establece que en células tumorales con la vía de Ras activa las funciones de los ARNs VA pueden ser eliminadas sin afectar a la
- 30 replicación viral. La invención por ello describe que los mutantes de ARNs VA pueden usarse para el tratamiento de tumores.

- El mecanismo de replicación selectiva en tumores de los mutantes VA descrito en el párrafo anterior se basa en que los efectores de Ras inactivan
- 35 la PKR. En muchos tumores nos encontramos también otro mecanismo por el cual no hay activación de PKR: la falta de respuesta al interferón. La secreción de interferón (IFN) de tipo alfa, beta o gamma es la primera

respuesta del sistema inmune innato frente a virus. IFN induce la expresión de PKR y los genes de ARNs VA del adenovirus antagonizan los efectos antivirales del IFN al inhibir la PKR. En células que no responden a interferón, la PKR no se induce y la cantidad de PKR en el citoplasma se mantiene a niveles basales muy bajos. Los genes de ARNs VA entonces dejan de ser necesarios para permitir la replicación viral. Está bien establecido que las células tumorales presentan defectos en la respuesta a IFN. De hecho un virus que es muy sensible a los efectos inhibitorios de IFN se ha usado para lisar selectivamente células tumorales y tratar tumores (Stojdl et al. Nature Medicine 2000. Vol 6, pp821-5). Conectando estas observaciones otra configuración de la presente invención es el uso de adenovirus mutantes de ARNs VA para tratar tumores con defectos en la vía del interferón.

La secuencia de los genes de ARNs VA del adenovirus serotipo 5 se muestra en la figura 2. El gen VAI del adenovirus 5 consta de 160 pares de bases, ocupando desde el par de bases 10620 hasta el 10779 en la secuencia del genoma adenoviral. El gen VAII consta de 161 pares de bases, ocupando desde el par de bases 10876 hasta el 11036. Una configuración de la presente invención contiene una delección dentro de estas secuencias. Otras configuraciones contienen delecciones que afectan a secuencias alrededor de éstas y que controlan la expresión de los genes VA. En particular secuencias de 30 pares de bases anteriores a los genes VA se han descrito involucradas en la regulación de su expresión (Fowlkes and Shenk, Cell 1980. Vol 22, pp. 405-13). Otra configuración contiene delecciones de las secuencias posteriores a los genes VA que controlan la terminación de su transcripción por la ARN polimerasa III (Gunnery et al., Journal of Molecular Biology 1999. Vol 286, pp. 745-57).

Durante el estudio de la función de los ARNs VA se han construido varios mutantes que eliminan su función. La presente invención establece que los mutantes previamente establecidos de genes VA que eliminan su función inhibitoria de PKR pueden ser usados para el tratamiento del cáncer. Nuevos mutantes de RNAs VA también pueden ser usados para la aplicación descrita en la presente invención. Existen varios métodos para manipular el genoma adenoviral. La construcción de mutantes de VA puede realizarse por ejemplo por mutagénesis dirigida usando protocolos publicados anteriormente por los inventores pero en lugar de usar fragmentos

adenovirales del hexón o de la fibra allí descritos usando un fragmento que contenga los genes VA. El procedimiento puede ser como sigue: Se obtiene ADN purificado de adenovirus tipo 5 por SDS-proteinasa K usando métodos estándar. Este ADN viral se corta con la enzima restricción Kpn I y un
5 fragmento de 2749 bp (Ad5 bp # 8537 – 11286) que contiene los genes de ARNs VA se purifica por electroforesis en gel. Este fragmento se clona por ligación en el plásmido pUC19 digerido con la misma enzima de restricción. La mutagénesis dirigida para deleccionar cualquiera de las secuencias VA indicadas más arriba se realiza sobre este plásmido usando protocolos
10 comerciales ("Quick Change site-directed mutagenesis kit", Stratagene, La Jolla, CA). El fragmento mutado Kpn I se introduce luego dentro del genoma viral por recombinación homóloga usando un plásmido que contiene el genoma completo del Ad5 digerido parcialmente con Rsr II (la diana en bp 10944 queda reparada por la recombinación homóloga). Del plásmido
15 resultante se obtiene el mutante VA por transfección en células 293 o en células con la vía de Ras activa.

Otros tipos de mutaciones y manipulaciones genéticas distintas a las mutaciones de los genes de ARNs VA descritas en la presente invención se
20 han realizado para obtener replicación selectiva en tumores. Estas pueden ser inserciones de promotores que son activos en células tumorales para controlar la expresión de genes virales y delecciones de funciones tempranas ("early E1 y E4) que bloquean las vías de RB o de p53. Una configuración de la presente invención es el uso de mutaciones en los genes de ARNs VA en
25 combinación con esas otras manipulaciones para obtener replicación selectiva en tumores.

En otra configuración de la invención los mutantes de ARNs VA pueden contener modificaciones de su cápside para aumentar su infectividad o
30 dirigirse a receptores presentes en la célula tumoral. Las proteínas de la cápside adenoviral se han modificado genéticamente para incluir ligandos que aumentan la infectividad o que dirigen el virus a un receptor en la célula tumoral. Dirigir el adenovirus al tumor también se puede conseguir con ligandos bifuncionales que unen al virus por un lado y al receptor tumoral por
35 otro. Por otro lado para aumentar la persistencia del adenovirus en sangre y con ello aumentar las posibilidades de alcanzar nódulos tumorales

diseminados, la cápside puede cubrirse con polímeros como el polietilenglicol. Se pueden configurar estas modificaciones en mutantes de ARNs VA. Otra configuración de la presente invención es el uso de mutantes de ARNs VA de otros serotipos de adenovirus distintos al Ad5. De los más de 50 serotipos de adenovirus humanos, existen por lo menos 47 serotipos en los que la secuencia de los genes de ARNs VA esta bien caracterizada (Ma and Mathews, Journal of Virology 1996. Vol 70, pp.5083-99). La mutación de los genes VA en esos serotipos puede usarse para obtener replicación condicionada a Ras activo o a resistencia a interferón.

10

Otra configuración de la presente invención describe el uso de adenovirus mutantes de ARNs VA que contienen otros genes para aumentar su citotoxicidad sobre células tumorales como el gen de la timidina quinasa, citosina deaminasa, genes proapoptóticos, inmunoestimuladores o supresores tumorales.

15

Producción, purificación y formulación de adenovirus mutados en ARNs VA.

Los adenovirus mutantes de ARNs VA se propagan siguiendo métodos estándar en los campos de la adenovirología y los vectores adenovirales. El método preferido de propagación es por infección de una línea celular permisiva a la replicación de mutantes de ARNs VA. Dicha línea tiene un oncogén Ras mutado o activo por ejemplo. La línea de carcinoma pancreático NP9 es un ejemplo de dicha línea. La propagación se realiza del siguiente modo por ejemplo: Las células NP9 se crecen sobre placas de cultivo celular de plástico y se infectan usando 50 partículas virales por célula. Dos días después el efecto citopático que refleja la producción de virus se observa como un arracimamiento de las células. Las células se recogen y se almacenan en tubos. Después de una centrifugación a 1000g durante 5 minutos, el precipitado celular se congela y descongela tres veces para romper las células. El extracto celular resultante se centrifuga a 1000g durante 5 minutos y el sobrenadante con virus se carga encima de un gradiente de cloruro de cesio y se centrifuga durante 1 hora a 35.000g. La banda de virus en el gradiente se carga de nuevo sobre otro gradiente de cloruro de cesio y se centrifuga durante 16 horas a 35.000g. La banda de virus se recoge y se dializa frente a PBS-10% glicerol. El virus dializado se

30
35

alícuota y almacena a -80°C . La cuantificación de número de partículas y unidades formadoras de placa se realiza siguiendo protocolos estándar. Tampón fosfato salino con glicerol al 10% es una formulación estándar para el almacenamiento de adenovirus.

5

Utilización de adenovirus mutantes de ARNs VA para el tratamiento del cáncer.

10

La presente invención describe el uso de adenovirus defectivos en sus genes de ARNs VA para tratar el cáncer. El tratamiento se basa en la replicación selectiva de los mutantes de ARNs VA en células con una vía de Ras activa o resistentes a los efectos del interferón.

15

Los protocolos para usar los mutantes VA en el tratamiento del cáncer siguen los mismos procedimientos que los usados en los campos de viroterapia con adenovirus y terapia génica con adenovirus. Existe una amplia experiencia en el uso de adenovirus no replicativos y replicativos en el campo de la terapia génica. En particular adenovirus con mecanismos de replicación selectiva distintos al propuesto en la presente invención han sido usados para tratar el

20 cáncer. Existen numerosas publicaciones de tratamiento de células tumorales en cultivo, en modelos animales y en ensayos clínicos con pacientes. Para el tratamiento de células en cultivos *in vitro* el adenovirus purificado en cualquiera de las formulaciones descritas más arriba se añade al medio de cultivo para la infección de las células tumorales. Para tratar tumores en

25 modelos animales o en pacientes humanos el adenovirus se puede administrar loco-regionalmente por inyección en el tumor o en una cavidad corporal donde el tumor se localiza o sistémicamente por inyección en el torrente sanguíneo. Como se ha practicado con otros adenovirus de replicación selectiva, el tratamiento de tumores con los mutantes de ARNs VA

30 descritos objeto de la presente invención se puede combinar con otras modalidades terapéuticas como la quimioterapia o radioterapia.

35

Ejemplo 1. Un adenovirus mutado en el gen VAI muestra replicación dependiente de Ras.

Para demostrar la dependencia de la replicación de un mutante de ARN VAI (dl331) en una vía activada de Ras hemos modulado el estado de activación

de Ras en células humanas. Aproximadamente 1.0×10^7 células humanas de riñón embrionario (línea 293) se sembraron en una placa de 10 cm de diámetro y se transfectaron con 24 microgramos de plásmidos que contenían o bien la proteína de fluorescencia verde (GFP), la forma constitutivamente activa de Ras (H-Ras V12) o el dominante negativo de Ras (H-Ras N17). Un protocolo estándar de fosfato cálcico se usó para la transfección. Cuarenta y ocho horas después de la transfección las células se transfirieron a nuevas placas. Para demostrar el efecto de la transfección de los plásmidos en la vía de Ras se miraron los niveles de expresión y de fosforilación de ERK (un efector de Ras) en un lisado celular por Western-blot. El lisado se obtuvo por incubación con tampón de lisis (20 mM Tris, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 1% Triton X-100, 10% glicerol, 5 mM NaF, 100 microM Na_3VO_4 , 1 mM PMSF, 10 microg/ml aprotinina, 10 microg/ml leupeptina) durante 1 hora a 4°C. Después de la centrifugación a 14,000xg, las proteínas del sobrenadante (10 microgramos por carril determinado por ensayo de Bradford) se separaron electroforéticamente en un gel del 10% poliacrilamida-SDS, y se transfirieron a una membrana de PVDF. La cantidad de ERK y fosfo-ERK se reveló mediante el protocolo de quimioluminiscencia de Amersham (ECL). Como anticuerpos primarios se usaron un anticuerpo monoclonal (Ab) en contra de ERK (Zymed) o un policlonal en contra de fosfo-ERK (Cell Signaling Tech.). Anti-IgG de ratón o anti-IgG de conejo conjugados a peroxidasa de rábano se usaron como anticuerpos secundarios. Siguiendo estos procedimientos demostramos que las células 293 no transfectadas tienen un bajo nivel de fosforilación de ERK, indicando una baja actividad de la vía de Ras. La transfección control con GFP no afecta estos resultados. La transfección con H-Ras V12 aumenta la fosforilación de ERK indicando la activación de la vía de Ras. Por el contrario la transfección con H-Ras N17 resulta en la inhibición de la vía de Ras (Figura 4 de la invención, panel superior).

Una vez verificada la modulación de la vía de Ras siguiendo los procedimientos anteriores pasamos a demostrar la replicación selectiva de los mutantes de ARNs VA como se describe a continuación. Las células transfectadas como se indica en el párrafo anterior se infectaron con el mutante de ARN VAI dI331 o con adenovirus tipo salvaje usando 10 unidades formadoras de placa por célula. La producción de virus se analizó cada día midiendo la cantidad de adenovirus en el sobrenadante mediante ensayos de

formación de placas en 293. El adenovirus tipo salvaje se replica de 7 a 10 veces mejor que el mutante VAI en células 293 control o transfectadas con GFP. La activación de la vía de Ras inducida por H-Ras V12 aumentó 10 veces la eficiencia de replicación del mutante VA de modo que su nivel de replicación alcanza el nivel del adenovirus tipo salvaje. Por el contrario la inhibición de la vía de Ras con H-Ras N17 disminuyó la replicación del mutante VA 2 veces. Por lo tanto, comparada con la replicación del adenovirus tipo salvaje, la replicación de un mutante de ARN VAI es 20 veces más dependiente de la activación de la vía de Ras que hemos realizado.

Ejemplo 2. Las células tumorales humanas con la vía de Ras activa permiten la replicación eficiente de un adenovirus mutado en su ARN VAI.

La replicación de un adenovirus mutado en el gen del ARN VAI (dl331) se cuantificó en la línea de cáncer de páncreas humano NP-9 que contiene una mutación en el codón 12 del gen K-Ras (GGT → GAT). La replicación se estimó por el efecto citopático (CPE) que el virus induce medido como una disminución de la cantidad de proteína en la monocapa celular (método BCA). En breve, las células NP-9 se sembraron en placas de 96 pocillos a 30.000 células por pocillo. Al día siguiente las células se infectaron con diluciones seriadas de dl331 o de adenovirus tipo salvaje desde una concentración de 1000 unidades formadoras de placa por célula. Las células infectadas se incubaron durante 5 días y el medio de cultivo se sacó para medir la cantidad de proteína restante en el pocillo. La figura 5 muestra los resultados obtenidos como el porcentaje de cantidad de proteína con respecto a pocillos no infectados frente a la dilución del inóculo viral. La dilución que produce el 50% de mortalidad (50% de reducción del contenido de proteína, IC₅₀) es una estimación de la potencia oncolítica de la preparación inicial de virus. En células con Ras mutado (NP9) la IC₅₀ obtenida para el mutante de ARN VAI dl331 y para el adenovirus tipo salvaje fue respectivamente 0.04 y 0.7 indicando un aumento de potencia del mutante de ARN VAI de 18 veces (Figura 5, panel superior y línea continua del panel inferior). En células con baja actividad Ras (293) estos valores fueron 0.018 y 0.003 indicando una disminución de potencia del mutante de ARN VAI de 6 veces. En conjunto, los resultados muestran que si comparamos la potencia oncolítica de un mutante de ARN VAI frente al adenovirus tipo salvaje en

células con Ras activo o en células con Ras casi inactivo, la activación de Ras potencia la replicación del mutante VAI unas 100 veces.

5 Ejemplo 3. Un adenovirus mutado en el gen de ARN VAI puede ser utilizado para tratar eficazmente tumores.

A continuación demostramos el efecto antitumoral de un adenovirus mutante de ARN VAI (dl331). Se realizó un experimento *in vivo* con ratones atímicos de la cepa Balb/c que contenían tumores con una vía de Ras activada (NP9).
10 Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las directrices de FELASA ("Federation of European Laboratory Animal Science Associations"). Un total de 1.2×10^7 células tumorales de la línea NP-9 cells se inyectaron subcutáneamente en cada flanco posterior del ratón. Después de 15 días los tumores formados (que alcanzan 70-80 mm³) se distribuyeron en los distintos
15 grupos experimentales (n=10 por grupo). Los tumores del grupo control recibieron dos inyecciones intratumorales de tampón salino (2 x 10 microl). Los del grupo tratado con el mutante VA recibieron dos inyecciones intratumorales (2 x 10 µl) de dl331 (10^9 partículas virales por tumor). La figura 6 muestra el volumen tumoral respecto al inicio del tratamiento (día 0). Los
20 resultados se presentan como media \pm S.E.M. La existencia de diferencias significativas entre los resultados se calculó usando un ensayo no paramétrico de datos no apareados de Mann-Whitney. Las curvas de crecimiento se compararon usando un análisis de la variancia. Los resultados se consideraron significativos si $p < 0.05$. Los cálculos se realizaron con el
25 paquete estadístico SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL). Existe una diferencia significativa entre el tamaño tumoral a días 16 y 21. Los tumores tratados con el mutante de ARN VAI dl331 mostraron regresión.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un adenovirus para el tratamiento del cáncer caracterizado porque el adenovirus es defectivo en sus ARNs virus asociados VAI y VAII.
5
2. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho adenovirus tiene una mutación en las secuencias de los genes ARNs VAI y VAII.
3. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho adenovirus tiene una
10 mutación en las secuencias que controlan la expresión de los genes ARNs VAI y VAII.
4. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que dicho adenovirus se inyecta en el tumor, en una cavidad donde se localiza el
15 tumor o en el torrente sanguíneo de un paciente con cáncer.
5. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que dicho adenovirus se combina con otras modalidades terapéuticas contra el
20 cáncer como la quimioterapia o la radioterapia.
6. Una composición que comprende un adenovirus con mutaciones genéticas en los genes de ARNs VA para conseguir replicación selectiva en células tumorales con una vía de Ras activa o refractarias a la acción del interferón.
- 25 7. Una composición para utilizar según las reivindicaciones 1 a 3 que comprende un adenovirus con mutaciones genéticas en los genes de ARNs VA y en uno o más genes del grupo E1a, E1b y E4 para conseguir replicación selectiva en tumores.
- 30 8. Una composición para utilizar según las reivindicaciones 1 a 3 que comprende un adenovirus con mutaciones genéticas en los genes de ARNs VA y a su vez promotores que regulan uno o más genes del grupo E1a, E1b y E4 para conseguir replicación selectiva en tumores.
- 35 9. Una composición que comprende un adenovirus con mutaciones genéticas en los genes de ARNs VA para conseguir replicación selectiva en células

tumorales y modificaciones en su cápside para aumentar su infectividad o dirigirlo a un receptor presente en una célula tumoral.

- 5 10. Una composición que comprende un adenovirus con mutaciones genéticas en los genes de ARNs VA que le confieren replicación selectiva en células tumorales y que a su vez que contiene otros genes usados comúnmente en el campo de terapia génica del cáncer como activadores de prodrogas, supresores tumorales o inmunoestimuladores.
- 10 11. Una composición que comprende un adenovirus humano derivado de un serotipo entre el 1 al 50 con mutaciones genéticas en los genes de ARNs VA que confieren replicación selectiva en células tumorales.

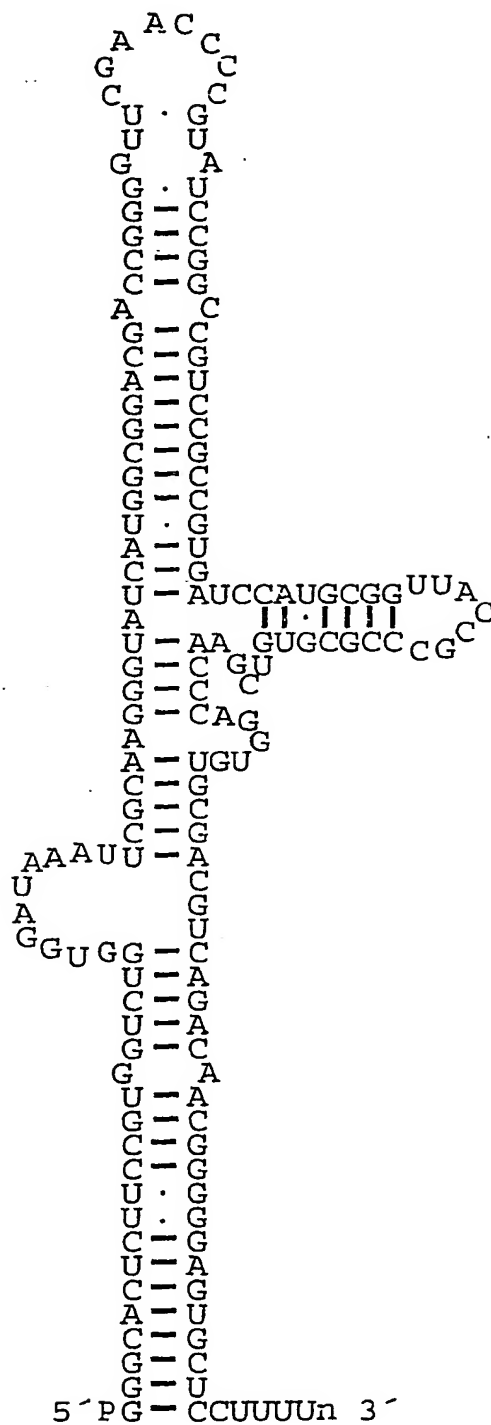


FIGURA 2.

CGGACGCGGT TCCAGATGTT GCGCAGCGGC AAAAAGTGCT CCATGGTCCG
GACGCTCTGG CCGGTCAGGC GCGGCAATC GTTGACGCTC TAGACCGTGC
AAAAGGAGAG CCTGTAAGCG GGCACTCTTC CGTGGTCTGG TGGATAAATT
CGCAAGGGTA TCA TGCGGA CGACCGGGT TCGAGCCCCG TATCCGGCCG
TCCGCCGTGA TCCATGCGGT TACCGCCCGC GTGTCAACC CAGGTGTGCG
ACGTCAGACA ACGGGGAGT GCTCCTTTTG GCTTCCTTCC AGGCGCGCG
GCTGCTGCGC TAGCTTTTTT GGCCACTGGC CGCGGCAGC GTAAAGCGGT
AGGCTGGAAA GCGAAAGCAT TAAGTGGCTC GCTCCCTGTA GCCGGAGGGT
TATTTTCCAA GGGTTGAGTC GCGGGACCCC CGGTTGAGT CTCGGACCCG
CCGGACTGCG GCGAACGGG GTTGCTCTCC CCGTCAIGCA AGACCCCGCT
TGCAAAATTCC TCCGGAACA GGGACGAGCC CCTTTTTCG TTTTCCAGA
TGCAATCCGGT GCTGCGGCAG ATGCGCCCC CTCCTCAGCA GCGGCAAGAG

FIGURA 3.

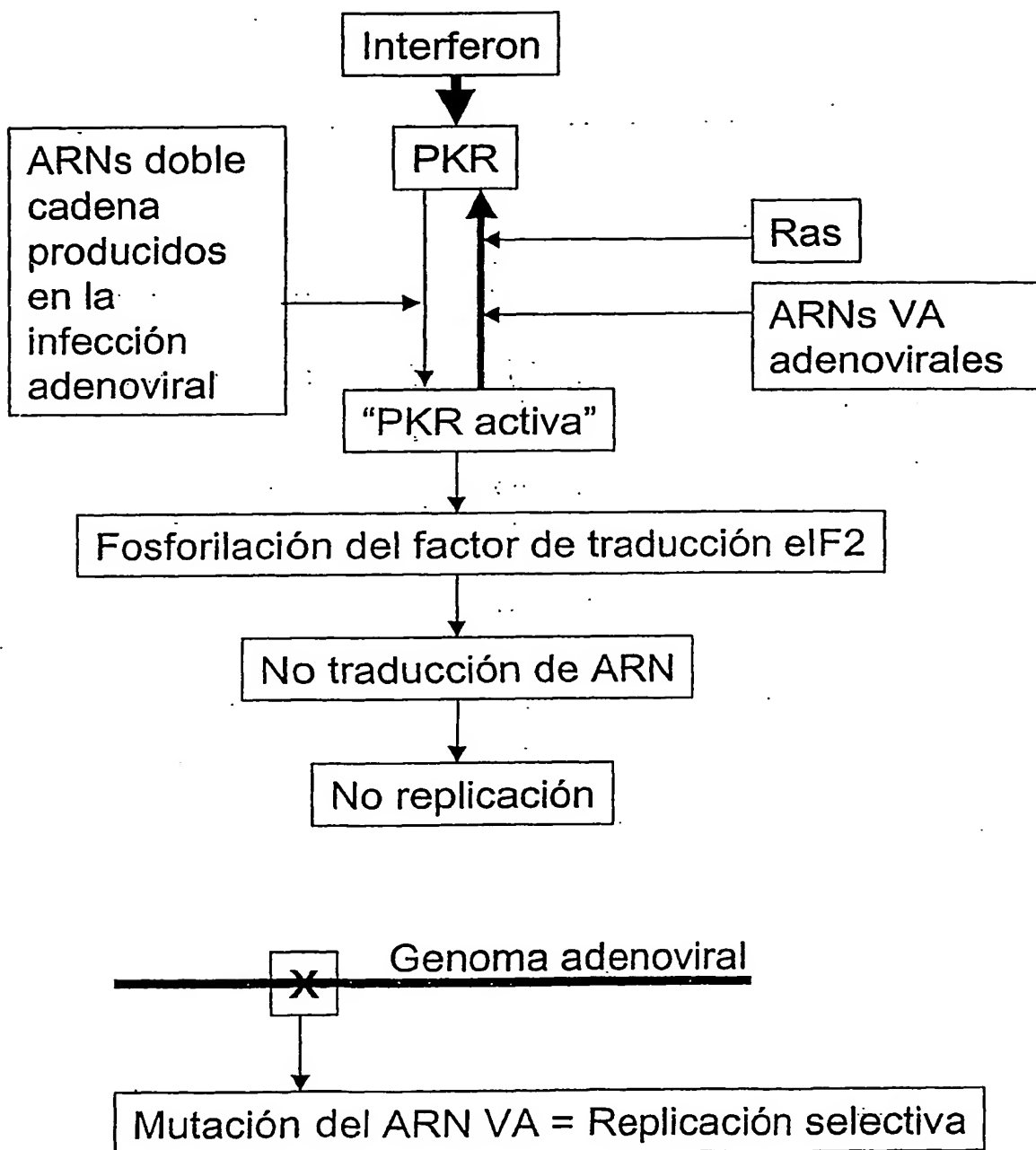


FIGURA 4.

Transfección de 293 con $\left\{ \begin{array}{l} \text{H-ras V12 (constitutivamente activo)} \\ \text{H-ras N17 (dominante negativo)} \end{array} \right.$

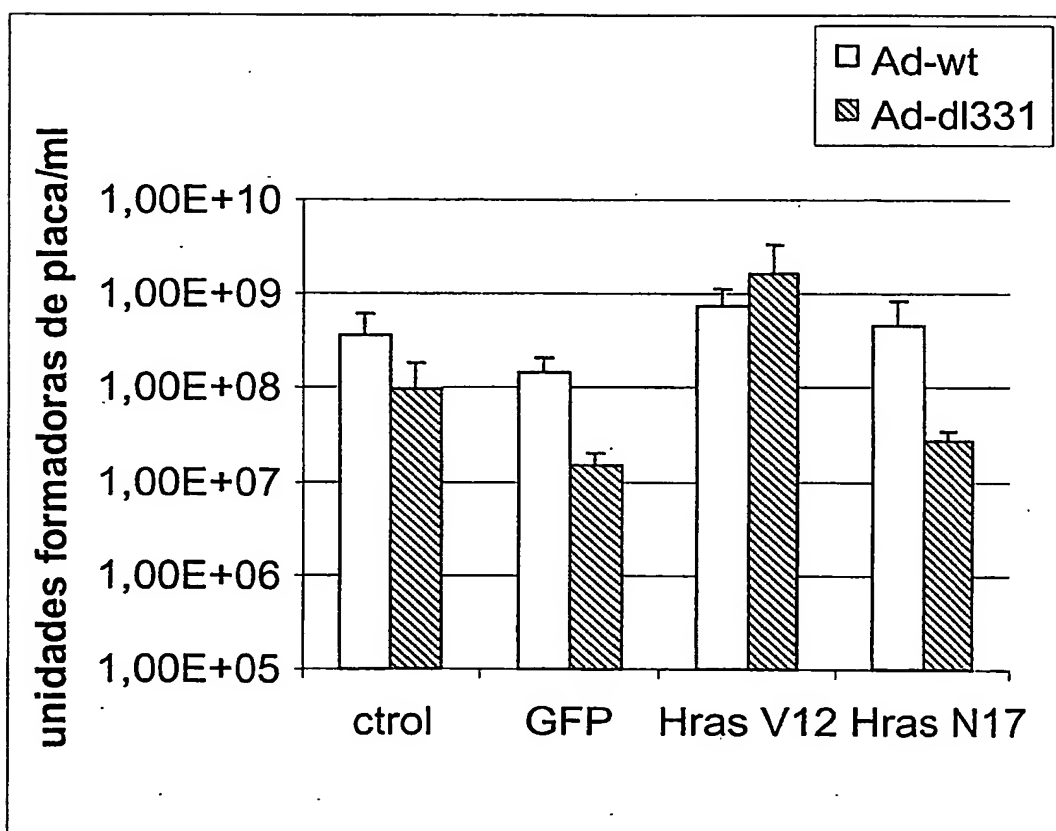
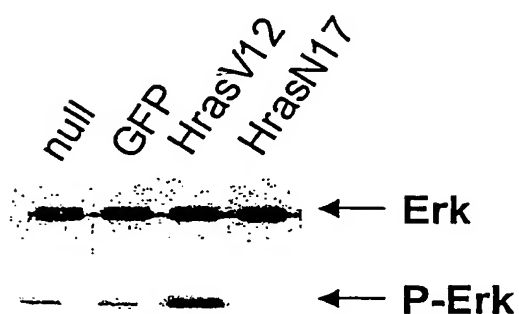


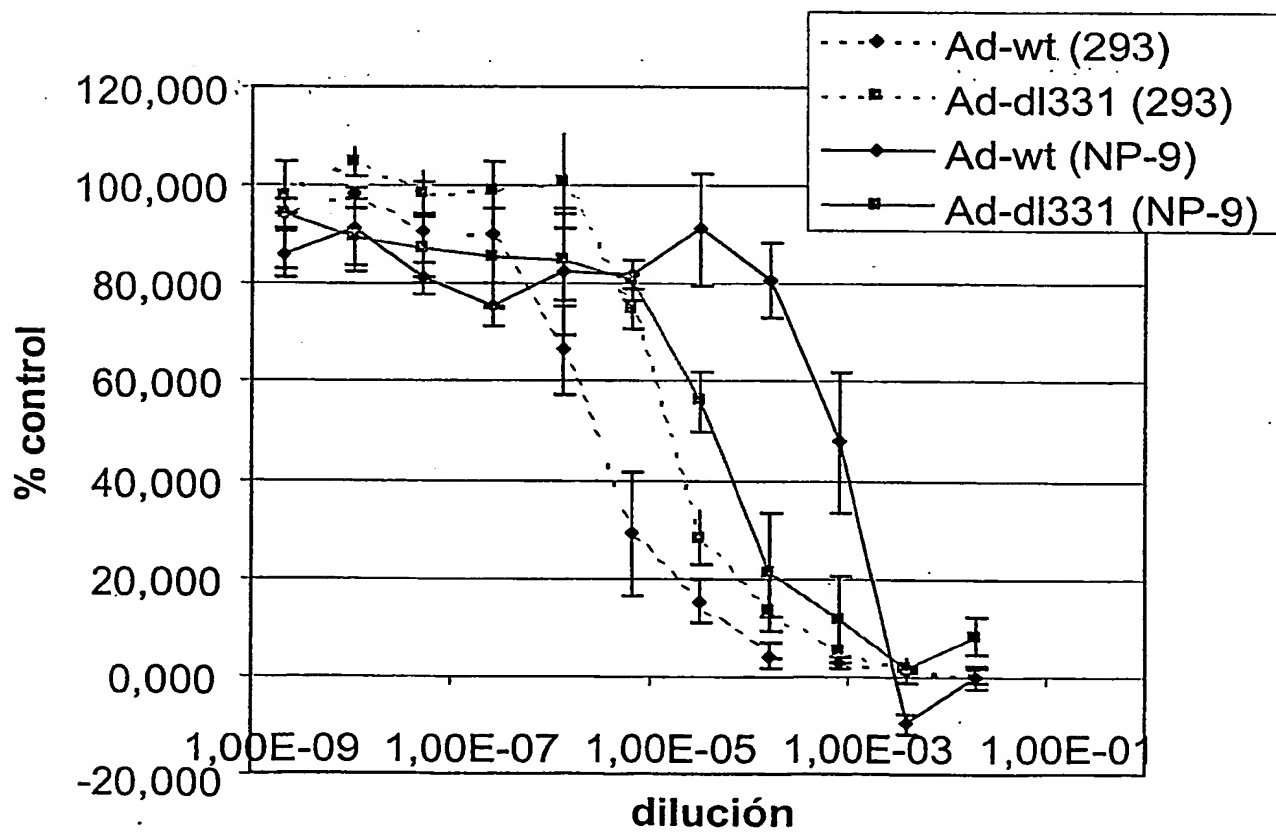
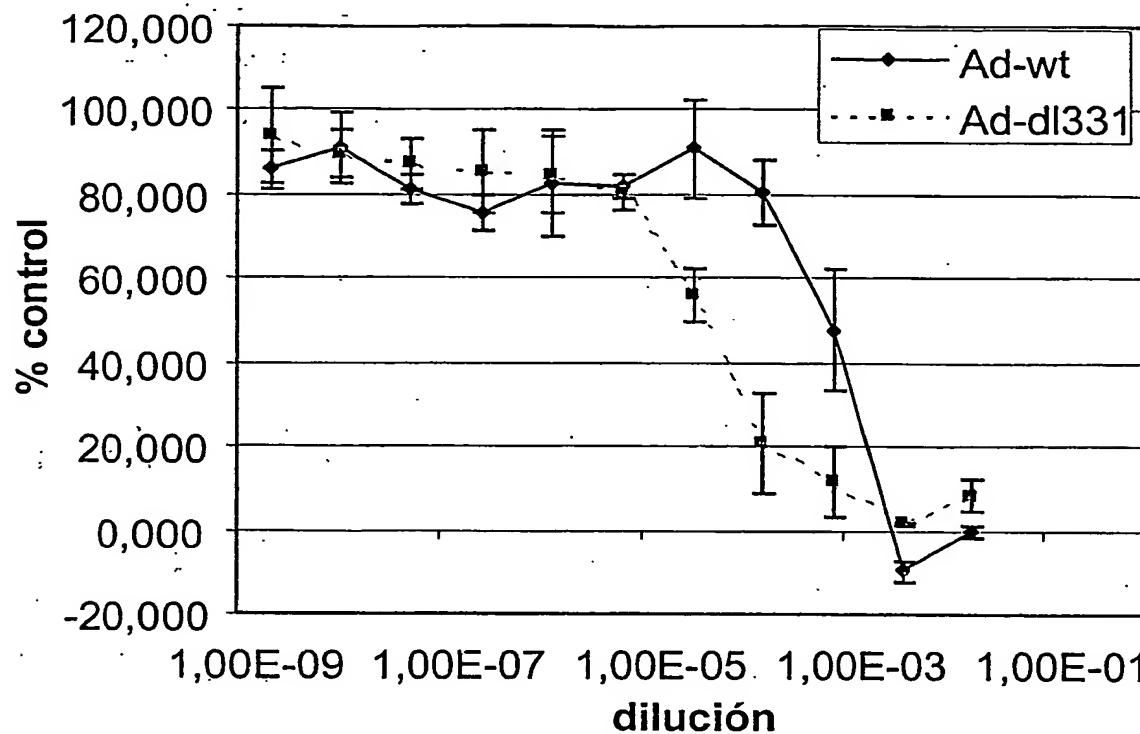
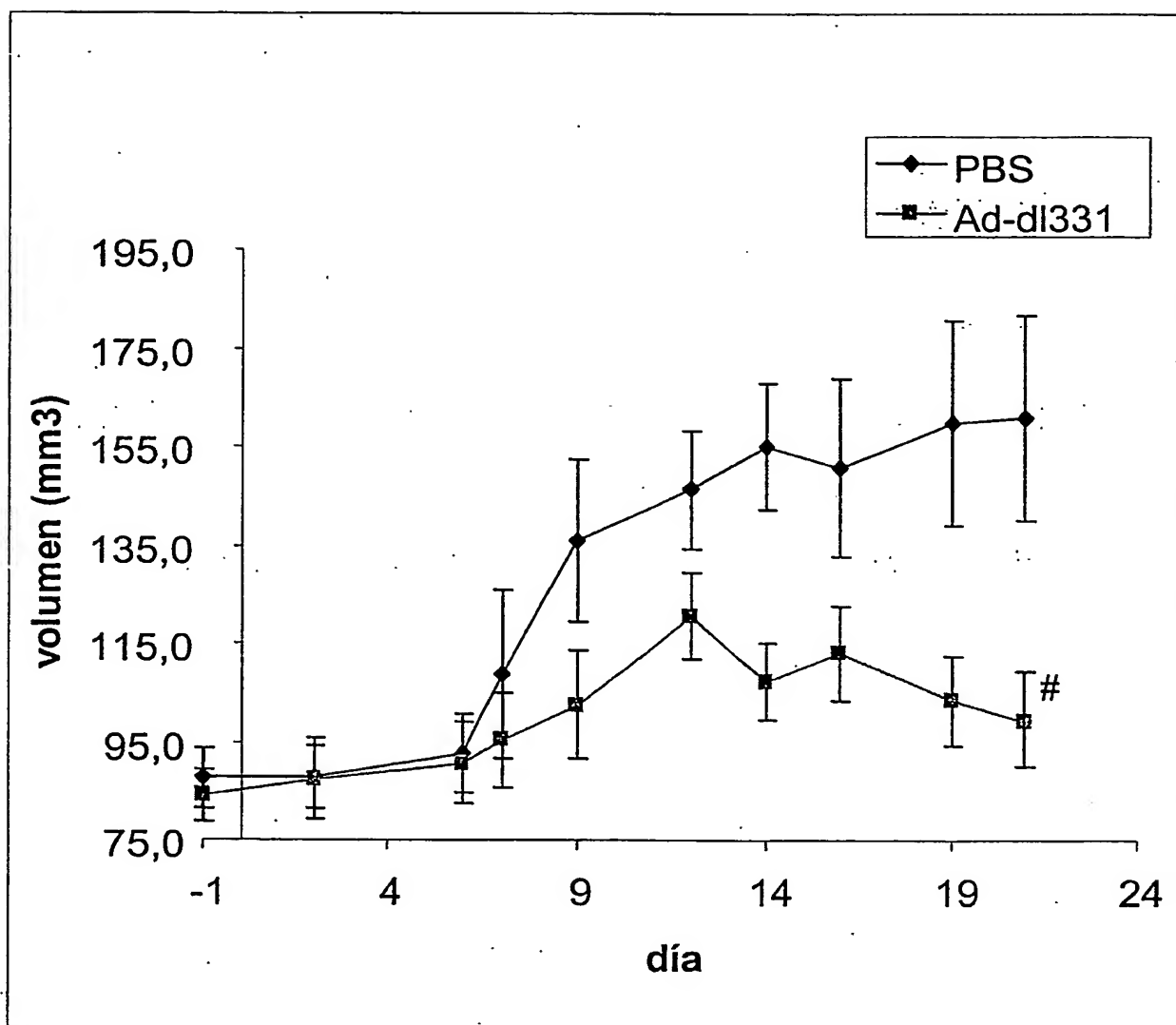
FIGURA 5.

FIGURA 6.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 03/00140

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K 35/76, A61P 35/00, C12N 7/04, C12N 15/861

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K, A61P, C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 0135970 A1 (ONCOLYTICS BIOTECH INC.) 25.05.2001. The whole document	1-6, 9, 11, 7, 8, 10
Y A	WO 9835028 A2 (BAXTER INTERNATIONAL INC.) 13.08.1998. page 8, lines 15-32; page 18, line 20 - page 26, line 2.	7, 8, 10, 4, 9, 11
A	US 5002874 A (KAUFMAN, R.J.) 26.03.1991	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 JUNE 2003 (09.06.03)

Date of mailing of the international search report

20 JUNE 2003 (20.06.03)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 03/00140

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-5
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 03/00140

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0135970 A1	25.05.2001	AU 200112626 A US 2002028195 A1 EP 1227828 A1 BR 200015491 A US 2002187465 A1 JP 2003514024 T	30.05.2001 07.03.2002 07.08.2002 15.10.2002 12.12.2002 15.04.2003
WO 9835028 A2	13.08.1998	EP 0968281 A2 JP 2001511012 T US 6403370 B1 US 2002142989 A1	05.01.2000 07.08.2001 11.06.2002 03.10.2002
US 5002874 A	26.03.1991	NONE	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 03/00140

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ A61K 35/76, A61P 35/00, C12N 7/04, C12N 15/861

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

CIP⁷ A61K, A61P, C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X Y	WO 0135970 A1 (ONCOLYTICS BIOTECH INC.) 25.05.2001. Todo el documento.	1-6, 9, 11, 7, 8, 10
Y A	WO 9835028 A2 (BAXTER INTERNATIONAL INC.) 13.08.1998. Página 8, líneas 15-32; página 18, línea 20 - página 26, línea 2.	7, 8, 10, 4, 9, 11
A	US 5002874 A (KAUFMAN, R.J.) 26.03.1991	

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

09 Junio 2003 (09.06.2003)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

20 JUN 2003

20.06.03

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la Búsqueda internacional

O.E.P.M.

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

Nº de fax +34 91 3495304

Funcionario autorizado

E. Relafío Reyes

Nº de teléfono + 34 91 3493047

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 03/00140

Recuadro I Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

De conformidad con el artículo 17.2.a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. ☒ Las reivindicaciones n°: 1-5
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
Se refieren a un tratamiento terapéutico del cuerpo humano. A pesar de ello, la búsqueda se ha realizado para estas reivindicaciones en base a los efectos atribuidos a los compuestos.
2. ☐ Las reivindicaciones n°:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones n°:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4.a).

Recuadro II Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°:

Indicación en cuanto a la reserva

- ☐ Las tasas adicionales han sido acompañadas de una reserva por parte del solicitante.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna reserva.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 03/00140

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 0135970 A1	25.05.2001	AU 200112626 A US 2002028195 A1 EP 1227828 A1 BR 200015491 A US 2002187465 A1 JP 2003514024 T	30.05.2001 07.03.2002 07.08.2002 15.10.2002 12.12.2002 15.04.2003
WO 9835028 A2	13.08.1998	EP 0968281 A2 JP 2001511012 T US 6403370 B1 US 2002142989 A1	05.01.2000 07.08.2001 11.06.2002 03.10.2002
US 5002874 A	26.03.1991	NINGUNO	